

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-128285

(43)公開日 平成7年(1995)5月19日

(51)Int.Cl.[®]

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

G 01 N 27/447

G 01 N 27/ 26

3 1 5 E

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全4頁)

(21)出願番号 特願平5-144574

(22)出願日 平成5年(1993)6月16日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 吉田 基子

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 滝 守

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 中山 佳苗

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

最終頁に続く

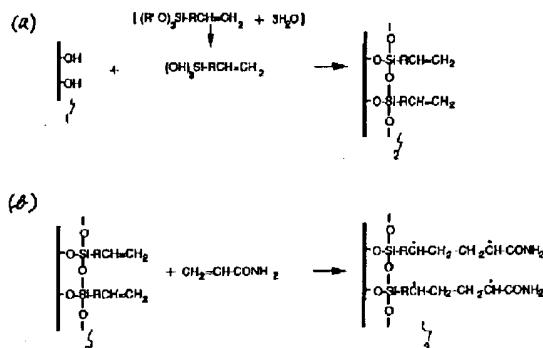
(54)【発明の名称】 電気泳動用支持体の作製法

(57)【要約】

【構成】ゲル結合キャピラリあるいは基板結合ゲルは、キャピラリあるいはスペーサを介して配置したゲルの錫型となる対向板の間隙にゲル作製用溶液を注入した後、器壁と化学結合させるとともに触媒反応により重合させる。

【効果】ゲル作製用混合液をガラス細管あるいは基板上に注入する際、器壁に気泡を残存させないため、ゲル作製の歩留まりと電気泳動分離の再現性が向上する。また、キャピラリ結合ゲル、基板結合ゲル作製工程を簡素化できる。

図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】アクリルアミド単量体あるいは架橋重合体をガラスあるいはセラミックス材料に結合させる際、単量体あるいはゲル作製用原液と、有機材料と無機材料の結合剤であるシランカップリング剤の混合液を、上記ガラスあるいはセラミックス材料と接触させ、上記単量体あるいは上記架橋重合体と上記無機材料との結合体を作ることを特徴とする電気泳動用支持体の作製法。

【請求項2】請求項1において、上記アクリルアミドを結合させる器材は毛細管を含む細管、フィルムあるいは板状の基板である電気泳動用支持体の作製法。

【請求項3】請求項1において、上記ゲル作製用原液とシランカップリング剤の混合液を1種類あるいは複数種類を、細管内あるいは板上の所定の位置に、所定の量配し、ゲル層を固定化する電気泳動用支持体の作製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は電気泳動用支持体の作製法に関する。

【0002】

【従来の技術】医用応用あるいは生体機構の解明を目的とした生体物質（タンパク、ペプチド、DNA、神経伝達物質、代謝物質など）の分離分析、遺伝子工学産物の純度検定、環境物質（水質、食品、農薬など）の分離分析手段として用いる電気泳動法の分離モードの一つにゲル電気泳動法がある。ゲルを分離用支持体とした試料の分子ふるい効果、あるいは目的物の選別効果をねらったものである。スラブゲル電気泳動法は、スペーサを介して対向させた二枚のガラスあるいはプラスチック板の間にはさんだゲルを用いる垂直型ゲル電気泳動法、またはゲルの片面をガラスあるいはプラスチック基板に固定した水平型オーブンゲル電気泳動法に大別できる。他方、キャピラリ電気泳動においてもゲルを充填したゲルキャピラリ電気泳動法が主としてタンパク、ペプチドの分離カラムとして用いられている。スラブゲル電気泳動法は分離能に優れ、特に二次元ゲル電気泳動法は一千種類もの成分を同時に分離できるため、多成分混合試料の分離分析に威力を発揮している。他方、キャピラリ電気泳動法は直径100μm程度の分離カラムを用いるため放熱性にすぐれ、高電圧印加が可能となり、高速分離、オンラインカラム検出、自動分析の特徴がある。

【0003】このゲルは固体と液体の混在する複雑な構造をしており、外的因子（たとえば印加電圧、pH、温度、イオン強度、湿度）の影響をうけて膨潤、収縮などの変形をするため、再現性のあるデータ解析は難しく、またゲルの取扱いも容易ではない。これらの対策としてゲルを支持基板あるいは細管内壁へ固定して用いている。他方フリーゾーン電気泳動において、ガラス表面のシラノール基は電気浸透流の原因になり、電気泳動分離像を乱す。このためアクリルアミド単量体やポリエチ

ングリコールなどをガラス表面に結合させて、泳動時の電気浸透流を抑えるための処置を施している。

【0004】このガラス材料とアクリルアミド単量体あるいは架橋重合体（ゲル）の結合には二種類の異なった反応基を持つ有機系ケイ素化合物であるシランカップリング剤 [(R' O)₃ Si R] を用いている。シランカップリング剤は、一方において、加水分解して無機物（ガラス、セラミックス、金属）と反応する残基R' O（メトキシ基、エトキシ基など）を有し、他方有機材料と化学結合する反応基R（メタクリル基、ビニル基、エポキシ基、アミノ基、メルカプト基など）をもつ。

【0005】シランカップリング剤によりガラス材料にアクリルアミド単量体またはゲルを結合する反応のプロセスは以下の通りである。ガラスを洗浄あるいはアルカリ溶液処理による表面処理をはかった後、稀釀したシランカップリング剤で表面処理、乾燥、場合によっては加熱処理を施す。シランカップリング剤の加水分解基があらかじめ分解してシラノール基となりガラス表面のシラノール基と縮合反応をする（図1（a））。つぎにこの20 シランカップリング処理ガラスにアクリルアミド単量体あるいはゲル作製用原液（アクリルアミド、架橋剤、重合触媒）を注入あるいは接触させた後放置して単量体あるいはゲルとガラスの結合体を作製する（図1（b））。

【0006】従来、アクリルアミドゲルは、アクリルアミド単量体（濃度範囲1-35%、最新電気泳動法；広川書店、1973）、架橋剤（BIS, PBE, DAE, DEG, EUB, EDA, DATD, BAC; 2-30%, Electrophoresis, 2, 220-228, 1981），重合触媒（AP-TEMED, AP-DMPN, AP-DMPN-Sodium Sulfate, Riboflavin-TEMED-紫外線照射、Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis；Walter de Gruyter, 1971）の配合により調製し、用途によって変性剤（ウレア、SDSを含むジチオスレートルや2-メルカプトエタノール）、添加物（グリセリン、エチレングリコール）、水溶性ポリマ、アガロース（特開昭55-5730号、特開昭55-110946号公報）等を混合して用いている。

【0007】
【発明が解決しようとする課題】キャピラリ管内あるいはガラス基板上にゲルを作製する場合、特に内容積に対する器壁の表面積の比率が大きいキャピラリ管や薄層ゲルの場合、第一工程のシランカップリング剤表面処理により一旦表面の撓水性が強くなると、その後第二の工程でゲル作製用原液注入時、その撓水性により気泡を残したままの充填となり、キャピラリ内に酸素の触媒反応阻害によるゲルの未重合部あるいは気泡をのこすことになる。

【0008】

【課題を解決するための手段】有機单量体、架橋剤を含むゲル作製用溶液（A）および重合触媒（B）溶液と、あらかじめ水あるいは有機溶媒に溶かしてあるシランカップリング剤（C）、を各々所定量使用時に混合し、この混合液をガラスあるいはセラミックス材料と接触させる。場合によっては有機单量体（A'）とシランカップリング剤（C）との混合液を、ガラスあるいはセラミックス材料と接触させる。この単純、且つ、短時間のプロセスで細管内あるいは基板への固定ゲル（あるいは单量体）を作製する。

【0009】

【作用】従来用いられているシランカップリングによるガラス-アクリルアミド結合は、まず、ガラスにシランカップリング剤を接触させてガラス表面のシラノール基とシランカップリング剤の加水分解により生じたシラノール基の間で縮合を行わせた（図1、プロセス1）後、二重結合を有するアクリルアミドと反応させてシランカップリング剤の他端との結合（図1、プロセス2）をはかる。他方、本発明はシランカップリング剤とアクリルアミドを混合したものをガラス材料に接触させ、シランカップリング剤は一端をアクリルアミドと結合し、加水分解で生じたシラノール側をガラス表面にむけこの縮合反応により共有結合体を形成する（図2、プロセス1）。したがって、ガラスは濡れのよい状態、すなわちシランカップリング処理による撥水性が付加されていない状態、で上記混合液と接触する。

【0010】

【実施例】

（実施例1）あらかじめ1MのKOHで1時間の表面処理、水洗、0.1MKCl洗浄、水洗した長さ50cm、内径100μm、外径335μm、ポリイミド樹脂で外部を補強（20μm厚）のキャビラリ、あるいは化学洗剤で洗浄、乾燥したキャビラリの一端をゲル作製用原液（A：アクリルアミド、N-N'-ビスアクリルアミド、緩衝液、TEMED），重合触媒（B：過硫酸アンモニウム）、シランカップリング剤（C：2%γメタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、50%エタノール溶液）の混合液（4%アクリルアミド、0.17%ビスアクリルアミド、100mMトリス、ホウ酸塩緩衝液、pH8.0、0.01%TEMED、0.025%過硫酸アンモニウム、10ppmγメタクリロキシプロピルトリメトキシシラン）に挿入し、他端から吸引注入する。これを30分から1時間室温放置するとキャビラリ内固定ゲルが得られる。混合液はキャビラリ注入直前に調製するが、A液を脱気したのち、これにB液を混合し、さらにC液を混合して用いる。

【0011】（実施例2）化学洗剤洗浄、水洗、乾燥した長さ50cm、内径100μm、外径335μm、ポリイミド樹脂で外部を補強（20μm厚）のキャビラリの一端をゲル作製用原液（A：アクリルア

ミド、N-N'-ビスアクリルアミド、緩衝液、TEMED），重合触媒（B：過硫酸アンモニウム）、シランカップリング剤（C：2%ビニルトリエトキシシラン、50%エタノール溶液），の混合液（4%アクリルアミド、0.17%ビスアクリルアミド、100mMトリス、200mMホウ酸の緩衝液、pH8.3、0.01%TEMED、0.025%過硫酸アンモニウム、5ppmビニルトリエトキシシラン）に挿入し、他端から吸引注入する。混合液はキャビラリ注入直前に調製するが、A液を脱気したのち、これにB液を混合し、さらにC液を混合して用いる。これを30分から1時間室温放置するとキャビラリ内固定ゲルが得られる。

【0012】（実施例3）電気泳動用支持体の一種である基板固定ポリアクリルアミド濃度勾配ゲルは次のプロセスで作られる。すなわち図1に示すように、ガラス基板1（100×100×1mm）と対向板2であるステンレスまたはシリコンコーティング処理など表面の不活性処理を施したガラス板（100×100×1mm）を左右両端に配置したスペーサ3（5×100×0.5mm）を介して組合せ、これをゲル作製容器4内に垂直に挿入した後、容器底部に濃度勾配作製機器6よりシランカップリング剤（2%γメタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、50%エタノール）を直前に混合したゲル作製用溶液（4-17%アクリルアミド、0.17-0.72%N-N'-メチレンビスアクリルアミド、125mMトリス塩酸緩衝液、pH8.9、0.03%テトラメチルエチレンジアミン、0.025%過硫酸アンモニウム）、50ppmγメタクリロキシプロピルトリメトキシシラン）をペリスターポンプ5を通して低濃度溶液から順次注入し、注入し終わったところで触媒反応が進みゲルの重合が起こる。基板ゲル6はこれを取りだし、対向板をはがして得られる。場合によってはゲル作製容器ならびにゲル作製用原液をいれる容器は温度制御して重合条件を調整する。

【0013】（実施例4）一端に三方コックをとりつけたガラス細管（長さ30cm、内径0.4mm、外径1mm）の他端をゲル作製用原液（A：アクリルアミド、N-N'-ビスアクリルアミド、緩衝液、TEMED），重合触媒（B：過硫酸アンモニウム）、シランカップリング剤[C：2%ビニルトリス（β-メトキシエトキシシラン）]の混合液[4%アクリルアミド、0.4%ビスアクリルアミド、100mMトリス、200mMホウ酸の緩衝液、pH8.3、0.01%TEMED、0.025%過硫酸アンモニウム、20ppmビニルトリス（β-メトキシエトキシシラン）]に浸漬し、この溶液の所定量を細管に吸引注入した後、三方コックを切り替えて所定の時間吸引した後アクリルアミドを重合させる。この操作により所定の厚さのゲル層を所定の位置に設けたゲル層付ガラス細管はインカラムフィルタとして電気泳動時試料内不要物の除去、あるいは分子ふるいの効果を

もたらす。混合液はガラス細管への注入前に調製するが、A液を脱気したのち、これにB液を混合し、さらにC液を混合して用いる。

【0014】(実施例5)あらかじめ1MのKOHで1時間の表面処理、水洗、0.1MKCl洗浄、水洗した長さ50cm、内径100μm、外径335μm、ポリイミド樹脂で外部を補強(20μm厚)したキャビラリ、あるいは化学洗剤で洗浄、乾燥したキャビラリの一端から4%アクリルアミド単量体と40ppmシランカップリング剤(2%γ-メタアクリロキシプロピルトリメチキシラン、50%エタノール溶液)の混合液を注入し、30分放置して器壁にアクリルアミドモノマ層を形成した後、余分の充填溶液をキャビラリから除去してからこれに緩衝液を満たす。このアクリルアミド単量体結合キャビラリはフリーゾーン電気泳動を行う際、電気浸透流を抑える効果がある。

【0015】

【発明の効果】従来、ゲルキャビラリあるいは基板固定ゲルの作製工程は第一ステップでガラス材と有機物であるアクリルアミドを結合するシランカップリング処理を施し、第二ステップでこのシランカップリング処理ガラスにゲル作製用溶液(アクリルアミド、架橋剤)と重合触媒の混合液を接触させ、アクリルアミド単量体モノマ

の結合ならびに重合化をはかり、ゲル状にする。本発明はこのプロセスを1回の操作に単純化している。

【0016】すなわち、単量体あるいはゲル作製用溶液とシランカップリング剤は混合した状態で直接ガラス細管あるいはガラス板で構成したスラブゲル作製容器内に注入してガラス表面へのアクリルアミド単量体結合、重合反応を行わせる。さらにこの方法ではシランカップリング剤の使用量を最小限にとどめることができる。本発明によると、従来第一ステップのシランカップリング処理により撥水性をおびた細管ガラスに第二ステップでゲル作製用溶液を注入する際器壁-溶液界面に生じる気泡の残存、それに付随して起る重合阻害、あるいは泳動時の通電遮断を引き起こすことなく、歩留まりおよび再現性のすぐれたゲル製造が可能になる。

【図面の簡単な説明】

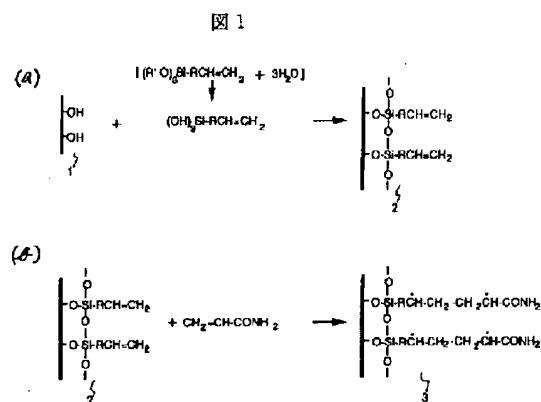
【図1】ガラス表面にアクリルアミド単量体あるいはアクリルアミドゲルを結合させる反応のプロセス説明図。

【図2】基板固定濃度勾配ゲル作製プロセスを示す説明図。

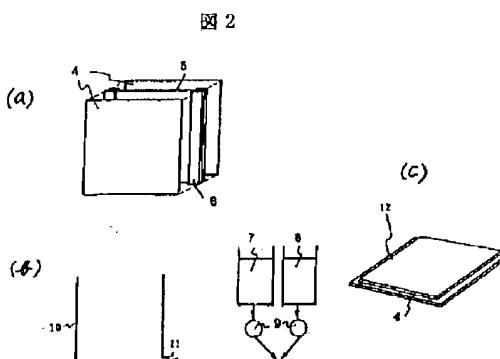
【符号の説明】

1…ガラス表面、2…シランカップリング処理ガラス、3…シランカップリング剤を介してガラスに結合したアクリルアミド。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 渡辺 ▲吉▼雄

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内